

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Füüsika Instituut

Aaro Abolkaln

**DEIONISEERITUD VEE AKTIVEERIMINE
PLASMAGA, SELLE MÕJU VÄHIRAKKUDE
ELULEMUSELE**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Juhendajad:

Jüri Raud, PhD

Sirli Raud, PhD

Tartu 2019

DEIONISEERITUD VEE AKTIVEERIMINE PLASMAGA, SELLE MÕJU VÄHIRAKKUDE ELULEMUSELE

Käesolevas bakalaureuse töös uuriti atmosfäärirõhulise madalatemperatuurilise argooni plasmajoa mõju deioniseeritud vette tekkivate reaktiivsete ühendite koostisele ja kontsentratsioonile ning sellise plasma-aktiveeritud vee mõju vähirakkude elulemusele. Töö eeliseks võrreldes varasemate uurimustega oli võimalus tekitada suletud keskkonnas muid gaasikeskkondasid kui õhk. Töös võrreldi kolme gaasikeskkonda: õhk, lämmastik ja hapnik.

Plasmafaasi karakteriseerimiseks mõõdeti kiirgusspektrid, vedelikfaasis plasmatöötamise käigus tekkivaid reaktiivseid ühendeid määrati UV neeldumisspektroskoopiaga ning vähirakkude elulemuskatsed toimusid rinnavähi rakuliini 4T1-ga, kus elulemus määrati MTT analüüsiga.

Töö tulemusena selgus, et gaasikeskkond mõjutab otseselt vedelikfaasis tekkivate reaktiivsete ühendite koosseisu ja kontsentratsiooni ning töös kasutatud meetod tagas väga puhtad gaasikeskkonnad, mis võimaldas uurida konkreetsete gaaside mõju iseseisvalt. Vähirakkude elulemuskatsed andsid positiivseid tulemusi õhu ja hapniku keskkonnas töödeldud vee jaoks, kuid lämmastiku keskkonnas vähirakkude elulemus ei muutunud.

CERCS: P200, P240, B200

Märksõnad: Vee töötlemine plasmaga, reaktiivsed hapniku- ja lämmastikuühendid, neeldumisspektroskoopia, rakkude elulemus

PLASMA ACTIVATION OF DEIONIZED WATER AND ITS IMPACT ON CANCER CELL VIABILITY

The aim of this thesis was to examine how a cold atmospheric argon plasma jet impacts the composition and concentrations of reactive species generated in distilled water and how this plasma-activated medium effects cancer cell viability. An advantage of the set-up used in this work in comparison with earlier research was the ability to create pure gas environments in a closed system around the plasma treatment area. In this work three gas environments were compared: air, oxygen and nitrogen.

Emission spectra were measured in order to characterize the plasma phase and UV absorption spectra were measured in order to determine reactive oxygen and nitrogen species generated in the liquid phase during plasma treatment. Cell viability experiments were conducted on breast cancer cell line 4T1 where the cell viability was determined using MTT assay.

As a result of this research it was found that the gas environment directly impacts the composition and concentrations of reactive species generated in liquid phase during plasma treatment. It was also determined that the method used to ensure a pure gas environment worked well and enabled to study the impact of different gases separately. The experiments on cancer cell viability showed positive results for liquids that were treated with plasma in air and oxygen environments while the liquid treated in nitrogen environment showed no effect on cancer cell viability.

CERCS: P200, P240, B200

Keywords: Plasma treatment of water, reactive oxygen and nitrogen species, absorption spectroscopy, cell viability

Sisukord

Sissejuhatus	5
Kirjanduse ülevaade	7
Plasma ja selles tekkivad reaktiivsed ühendid	7
Reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite (RONS) määramise meetodika	9
Neeldumisspektroskoopia RONS-i määramisel	11
Plasma meditsiinirakendused ja RONS-de bioloogiline toime	12
Eksperimentaalne osa	14
Katseseadme ehitus ja tööpõhimõte	14
Mõõtmiste läbiviimine ja andmetöötlus	16
Andmetöötlus	18
Tulemused ja analüüs	21
Plasmafaasi karakteriseerimine	21
Kiirgusspektrid	21
Elektronide kontsentratsioon	23
Vedelikfaasi karakteriseerimine	25
Lahuse pH	25
Plasma-aktiveeritud vedeliku reaktiivsete ühendite kontsentratsioonid	25
Vähirakkude elulemusuuringute tulemused	29
Järeldused	31
Kokkuvõte	32
Tänuavaldused	33
Kirjanduse loetelu	34
Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks	37

Sissejuhatus

Käesolev töö uurib atmosfäärirõhulise madalatemperatuurilise kõrgsagedusliku argooni plasmajoa (ingl CAP – *cold atmospheric plasma*) mõju deioniseeritud vette tekkivate reaktiivsete ühendite koostisele ja kontsentratsioonile ning sellise plasma-aktiveeritud vee mõju vähirakkude elulemusele. Madalatemperatuuriliseks nimetatakse plasmasid, mille puhul raskete osakeste (aatomid, molekulid, ioonid) temperatuur on vahemikus 300-1000 K, samas kui elektronide temperatuur on tüüpiliselt vähemalt ühe suurusjärgu võrra suurem. Raskete osakeste ning elektronide drastiliselt erinevate temperatuuride tõttu nimetatakse sellist plasmata ka mittetasakaaluliseks ja sellisel juhul toimuvad aatomite ja molekulide ergastused ning ioniseerimine enamasti elektronlöögiga [1]. Madalatemperatuurilise plasmajoa elektronide tihedus jääb enamasti alla 10^{19} m^{-3} [2].

Madalatemperatuurilise plasma vastu on viimastel aastatel tekkinud suur huvi eelkõige meditsiini valdkonnas. Praeguseks on haiglates juba rakendamist leidnud madalatemperatuurilise plasma allikad, mida kasutatakse haavade, naha- ja seenhaiguste raviks ning pindade steriliseerimiseks [3]. Potentsiaalselt on madalatemperatuurilise plasmaga võimalik läbi viia vähese invasiivsusega operatsioone. Võrreldes tavapärase laserkirurgiaga, mis põhineb soojuslikul toimel ja toob kaasa juhuslike rakkude surma, mõjub madalatemperatuuriline plasma allpool soojuslike kahjustuste piiri – eelkõige keemiliselt reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite kaudu, soodustades selektiivselt teatud rakkude surma [3]. On leitud, et plamaproductid tapavad ka selektiivselt mitmesuguste vähitüüpide rakke, samas mõju tervetele rakkudele on väiksem. Selline selektiivsus võimaldaks plasmata kasutada vähiravis ja seetõttu on alates efekti avastamisest aastal 2007 teemat intensiivselt uuritud kasutades (valdavalt *in vitro* katsetes) enam kui 20 erineva vähitüübi rakke [4].

Selleks, et tulevikus oleks võimalik plasmata ravieesmärkidel kasutada, on asutud põhjalikult uurima nii plasma poolt tekitatavaid reaktiivseid ühendeid (koosseis, kontsentratsioon), kui ka nende mõju bioloogilistele proovidele. Reaktiivsete ühendite koosseisu ja kontsentratsiooni on võimalik muuta varieerides plasmaparametreid, sest vedelikus tekkivate ühendite koosseis on suuresti määratud plasmafaasi reaktiivsete ühenditega [3].

Plasmafaasi reaktiivsete ühendite uurimisel on kasutatud nt Fourier-pöörde infrapuna (FTIR) spektroskoopiat, laser-indutseeritud fluorestsentsi ja massispektromeetria [5]. Samuti annab olulist teavet kiirgusspektri analüüs. Reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite määramiseks

vedelikus on kasutatud spektroskoopilisi meetodeid nagu UV neeldumisspektroskoopiat. Lühiealiste ühendite uurimiseks on kasutatud peamiselt spinn-lõksustamist ja elektronide paramagnetresonants (EPR) spektroskoopiat [5]. H_2O_2 ja nitraatide ning nitritite määramiseks on võimalik kasutada ka kolorimeetrilisi meetodeid [6].

Käesoleva töö eesmärgiks oli uurida deioniseeritud vees atmosfääri rõhul argooni plasmaga kiiritamisel tekkivate reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite koosseisu ja kontsentratsiooni erinevates gaasikeskkondades, kasutades selleks neeldumisspektroskoopia meetodit. Samuti uuriti plasma-aktiveeritud vedelike mõju vähirakkude elulemusele. Antud töö eeliseks võrreldes varasemate uurimustega on võimalus tekitada suletud keskkonnas muid gaasikeskkondasid kui õhk, mis võimaldab täpsemalt uurida taustgaasi mõju töötluse käigus tekkivatele ühenditele.

Järgnevas peatükis antakse kirjanduse põhjal ülevaade plasmast ning selle mõjul tekkivatest reaktiivsetest ühenditest nii gaasi- kui vedelikfaasis; põhilistest keemilistest reaktsioonidest reaktiivsete ühendite vahel; meetoodikast, millega on ühendeid tuvastatud nii gaasi- kui vedelikfaasis, ja plasma meditsiinirakendustest ning bioloogilisest toimest. Seejärel esitatakse töö põhilised tulemused ja analüüs ning töö lõpetavad järeldused ning kokkuvõte.

Kirjanduse ülevaade

Plasma ja selles tekkivad reaktiivsed ühendid

Suure elektrivälja tugevuse korral võib gaas ioniseeruda, teatud kriitilisest elektriväljatugevusest suurematel väärtustel muutuda elektrit juhtivaks – tekib plasma. Plasmas esinevad nii ioniseeritud kui ka ergastatud aatomid ja molekulid, mis tänu kõrgemale keemilisele reaktiivsusele võimaldab mitmesuguseid keemilisi protsesse, mis tavatingimustel sel määral ei toimu.

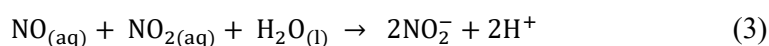
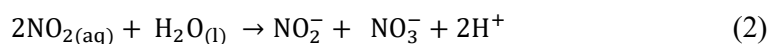
Plasma biomeditsiinilistes uuringutes ja rakendustes on kasutatud peamiselt kahte tüüpi plasma allikat: dielektrik-barjäärilahendus (DBL) ja plasma joad [4]. DBL-i korral tekib plasma elektroodide vahelise gaasi ioniseerimisel, kusjuures elektroode eraldab lisaks ka dielektrik. Plasmajugade puhul indutseeritakse plasma gaasivoos tavaliselt väikese läbimõõduga dielektrikust torus (sisediameeter ~1 mm) tüüpiliselt mõnes inertgaasis. Torust väljudes plasma laieneb ümbritsevasse gaasikeskkonda, reageerides keskkonna aatomite ning molekulidega. Mõlema allika korral on võimalik saavutada plasma temperatuur, mis jääb toatemperatuuri lähedale ning meditsiinarakenduste korral ei ületa üldiselt 40°C. DBL võimaldab töödelda korruga suuremaid pindasid, kuid plasmajuga võimaldab plasmatöötlust teha täpsemalt, kuna plasmajuga on suunatud ja väiksema diameeteriga [7].

Enamik plasmameditsiini rakendustest töötavad õhu keskkonnas atmosfääri rõhul, mistõttu on palju uuritud plasmakeemilisi protsesse just selles keskkonnas. Plasmaga töödeldavaks materjaliks on valdavalt vedelik (rakukultuuri sööde, deioniseeritud vesi) samuti biokiled, koed, nahk [8]. Kuna vedelikus tekkivate ühendite koosseis on suuresti määratud plasmafaasi reaktiivsete ühenditega [3], on oluline uurida, kuidas toimub reaktiivsete osakeste ülekandumine gaasifaasi ja vedelikfaasi vahel ning missugused keemilised protsessid toimuvad mõlemas faasis ning faaside üleminekupiiril.

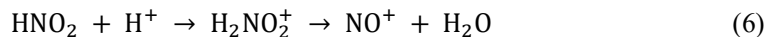
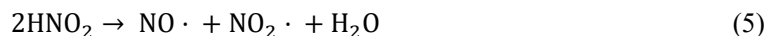
Õhu keskkonnas genereeritud plasmas on faaside üleminekupiirkonnas nii atomaarset hapnikku, lämmastikku kui ka vesinikku, mis tekivad vastavate molekulide dissotseerumisel plasmas. Lämmastikuaatomid pärinevad põhiliselt gaasikeskkonnast, kuid vähesel määral ka vedelikus lahustunud lämmastikust. Hapnikuaatomid pärinevad nii gaasikeskkonnas olevatest hapniku molekulidest kui ka lagunenenud veemolekulidest, mis on kas gaasifaasis või vedelikfaasis. Vesinikuaatomid pärinevad samuti lagunenenud veemolekulidest. Kuna plasma

töötamise ajal vedeliku temperatuur tõuseb, siis on ka suurenenud aurumine, mis ühelt poolt suurendab radikaalide (nt $\text{OH}\cdot$) kontsentratsiooni faaside üleminekupiirkonnas, teisalt muutub gaaside lahustuvus vedelikus temperatuuri kasvades väiksemaks. [9]

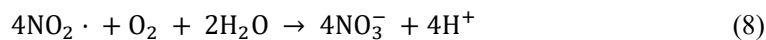
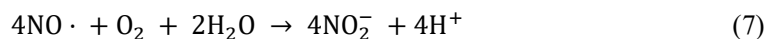
Hapniku- ja vesinikuaatomid moodustavad hüdroksiidioone $\text{OH}\cdot$ ja hüdroksüülradikaale $\text{OH}\cdot$. Lühiealised hüdroksüülradikaalid saavad kombineeruda stabiilsemateks vesinikperoksiid (H_2O_2) molekulideks (1). Lämmastiku- ja hapnikuaatomid moodustavad lühiealisi radikaale nagu $\text{NO}\cdot$ ja $\text{NO}_2\cdot$, mis omakorda saavad difundeeruda töödeldavasse vette reageerides seal edasi ja moodustades stabiilseid nitrit (NO_2^-) ja nitraat (NO_3^-) ioone. Lisaks NO_2^- ja NO_3^- tekkele, põhjustavad lahustunud lämmastikoksiidid hüdroolüüsudes ka vesinikioonide teket vees, mida kirjeldavad reaktsioonivõrrandid (2) ja (3). Selle tulemusel lahus hapestub ja lahuse pH langeb. [8]



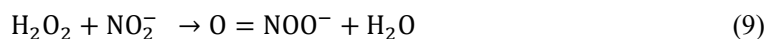
Happelises keskkonnas ($\text{pH} < 3,5$) pole nitritioonid stabiilsed. Lämmastikhape, mis on keemilises tasakaalus nitritioonidega (4) laguneb lämmastikoksiidiks $\text{NO}\cdot$ ja lämmastik dioksiidiks $\text{NO}_2\cdot$ (5) või moodustab NO^+ ioone lämmastikhappe protoneerumise tõttu (6). [8]

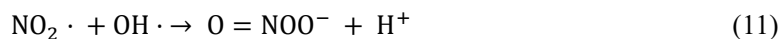


$\text{NO}\cdot$ ja $\text{NO}_2\cdot$ võivad reageerida ka vees lahustunud hapnikuga, mille tulemusel tekivad samuti nitrit- ja nitraatioonid (7) (8). [8]



Vesinikperoksiid moodustab reaktsioonis nitritiooniga peroksünitriti (9), mis on NO_3^- struktuuriisomeer. Peroksünitrit võib tekkida ka superoksiidi ja lämmastikoksiidi radikaalide (10) ning $\text{NO}_2\cdot$ ja $\text{OH}\cdot$ radikaalide (11) vahelistes reaktsioonides.





Reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite (RONS) määramise meetoodika

Peamiste huvipakkuvate hapniku- ja lämmastikuühendite (H_2O_2 , NO_2 - ja NO_3 -, OH , O_3 , O_2 -jne) detekteerimiseks on mitmeid meetodeid. Nendest levinumateks on kolorimeetria, elektronide paramagnetresonants (EPR) spektroskoopia, Fourier' teisenduse infrapuna (FTIR) spektroskoopia ja ultravioletne-nähtav (UV-Vis) neeldumisspektroskoopia.

Kolorimeetrilisel detekteerimisel viiakse lahuses läbi keemiline reaktsioon uuritava ühendi ja reagenti vahel, mille tulemusena muutub lahuse värvus ja sõltuvalt uuritava ühendi kontsentratsioonist muutub ka värvuse intensiivsus. Mõõtes seejärel mingile konkreetsele lainepikkusele vastavat neelduvust lahuses (nt läbi küveti) saab teada esialgu lahuses olnud uuritava ühendi kontsentratsiooni. H_2O_2 määratakse sageli kolorimeetriliselt reaktsioonist titanüülsulfaadiga (TiOSO_4), kus lahuse neelduvust mõõdetakse lainepikkusel 407 nm [6]. NO_2 - määratakse samuti kolorimeetriliselt reaktsioonist nn Griessi reagentiga, kus lahuse neelduvust mõõdetakse 540 nm juures. NO_3 - määratakse kas reaktsioonist 2,6-ksüleenooliga või muudetakse see esmalt kas ensümaatilisel või vanaadium(III)kloriidi abil NO_2 - ning seejärel määratakse Griessi testiga.

Samuti määratakse H_2O_2 kontsentratsiooni iodomeetrilise tiitrimisega, mis põhineb vesinikperoksiidi reaktsioonil kaaliumjodiidiga (KI) happelises keskkonnas koos ammoniummolübdadaadiga, mis on katalüsaatoriks. Titrandina kasutatakse naatriumtiosulfaati ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$). Tiitrimise käigus muutub lahuse värvus sinisest helekollaseni või peaaegu värvusetuks [6].

Lühiealisi (ja paramagnetilisi) ühendeid on määratud elektronide paramagnetresonants (EPR) spektroskoopiaga. EPR on analoogne tuumamagnetresonantsile, kuid EPR-i puhul mõõdetakse paardumata elektronide lõhenenud energiatasemete erinevust välises magnetväljas (Zeemanni efekt), mis annab karakteristikud spektrid. Kuna nii $\bullet\text{OH}$ kui ka O_2 - on väga lühikese elueaga (mikro- ja nanosekundite suurusjärgus) ning tihtipeale on mõõdetavate lahuste kontsentratsioonid väikesed, tuleb lisaks kasutada nn spinn-lõkse ehk aineid, mis reageerides radikaalidega moodustavad spetsiifilisi kuid endiselt paramagnetilisi ühendeid. Kuid isegi spinn-lõksude lisamisega kaasnevad mitmed keerukused ja konkreetse spinn-lõksu valik tuleb teha väga spetsiifiline vastavalt mõõdetavatele radikaalidele [6].

Gaasifaasis ja vedelikfaasis olevate ühendite määramiseks on võimalik kasutada ka Fourier teisenduse infrapuna (FTIR) spektroskoopiat. FTIR-i puhul saadakse infrapunavalguse kiirgus- või neeldumisspekter, mille põhjal on võimalik määrata erinevad aatomitevahelised sidemed ning proovi keemiline koostis.

Lisaks eelnevalt mainitud meetoditele on hapniku- ja lämmastikuühendite detekteerimiseks kasutatud ka UV-Vis spektroskoopiat, mille korral mõõdetakse proovi neelduvus sõltuvalt elektromagnetkiirguse lainepikkusest ultravioletti ja nähtava valguse piirkonnas. UV-Vis spektroskoopiat käsitletakse pikemalt järgmises alapeatükis, kuna seda rakendati käesolevas töös reaktiivsete ühendite koosseisu ja kontsentratsiooni määramisel vedelikfaasis.

Neeldumisspektroskoopia RONS-i määramisel

Aatomid neelavad elektromagnetkiirgust konkreetsetel lainepikkustel. Neelduvus konkreetsetel lainepikkustel on tingitud aatomi diskreetsetest energiatasemetest, mis vastavad erinevatele elektronseisunditele. Reaktiivsed hapniku- ja lämmastikuühendid on aga molekulid ning molekulide korral toimub kiirguse neeldumine tavaliselt laiemas lainepikkuste vahemikus. See on tingitud sellest, et molekulide puhul on lisaks elektronseisundite muutustele veel ka võnke- ja pöörlemisseisundite muutused. Erinevaid võnke- ja pöörlemisseisundeid ning neile vastavaid energiatasemeid on väga palju ning need erinevad teineteisest väga väikeste energiatega võrra. Seetõttu on molekulid samaaegselt erinevatel kuid teineteisele väga lähedastel energiatasemetel, mis pole tüüpilise spektromeetriga lahutatavad ning tulemuseks on pidevspekter laiemas lainepikkuste vahemikus - neelduvusriba. Sageli jääb molekulide neelduvusriba maksimum UV kiirguse piirkonda, mistõttu rakendatakse molekulide määramiseks tihti peale just neeldumisspektroskoopiat UV ja nähtava valguse diapsoonis. [10]

Kiirguse neeldumist lahuses ja lahuse omadusi seob omavahel Beer-Lambert'i seadus:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = -\epsilon c l$$

A – lahuse neelduvus, I_0 – esialgne kiirguse intensiivsus antud lainepikkusel, I – kiirguse intensiivsus pärast proovi läbimist, l – optiline teepikkus (nt proovi läbimõõt), c – neelava aine kontsentratsioon, ϵ – neeldumistegur, mis on omane igale ainele ja sõltub ka kiirguse lainepikkusest.

Beer-Lambert'i seadus on väga heas kooskõlas katsetega, eriti kui neelduvust põhjustab üks aine ning neelava aine kontsentratsioon lahuses pole väga suur. Siiski ei kehti see seadus universaalselt ning esineb mitmeid erandeid, mille korral kujuneb seos keerukamaks. Seadus ei kehti näiteks neelava aine kõrge kontsentratsiooni korral; kui lahuses on fluorestseeruv ühend; kui kiirgus põhjustab keemilisi muutusi neelavas aines või kui lahustunud aine ja lahus moodustavad omavahel uusi ühendeid. [10]

Eksperimentaalselt on tõhus proovi neelduvust määrata võrdlusmeetodil. Neelduvuse saamiseks jagatakse neelavat ainet sisaldava proovi läbinud kiirguse intensiivsus I_{proov} proovi läbinud kiirguse intensiivsusega, kui proov ei sisalda neelavat ainet - $I_{\text{tühi}}$. Antud suhte negatiivne logaritm annab konkreetsele lainepikkusele vastava neelduvuse:

$$A = -\log\left(\frac{I_{\text{proov}}}{I_{\text{tühi}}}\right)$$

UV-VIS spektromeetrias kasutatavad spektrofotomeetrid koosnevad kolmest funktsionaalsest osast: valgusallikast, monokromaatorist ja detektorist. Valgusallikana on levinud deuteriumlamp, millel on pidev kiirgusspekter UV piirkonnas. Nähtava valguse piirkonna jaoks kasutatakse tavaliselt sekundaarset allikat – näiteks volframlampi. Monokromaatorites on enim kasutusel difraktsioonivõred, mis lahutavad proovi läbinud liitvalguse spektriks. Detektoritena on kasutusel nii fotoelektronkordistid, fotodiodid kui CCD-sensorid (CCD – *charge coupled device* ehk laengsidestusseadis). Fotoelektronkordistite ning fotodiodide miinus on, et see võimaldab kiirguse intensiivsust korraga mõõta vaid ühe lainepikkuse jaoks, mistõttu eeldab kogu spektri mõõtmine mehaanilist süsteemi monokromaatori võre pööramiseks, et oleks võimalik skaneerida üle soovitud lainepikkuste vahemiku – see on aga aeganõudev protsess. CCD-sensorid võimaldavad kogu spektri üles võtta ühe mõõtmisega, mistõttu on nende kasutamine detektorina oluliselt kiirem ja mugavam.

UV-VIS spektroskoopia eelised on selle suhteliselt lihtne ülesehitus ja täpsus. Samuti on suureks eeliseks, et UV-Vis spektroskoopia on mitte-invasiivne, erinevalt kolorimeetrilistest meetoditest ja EPR-spektroskoopiast. See võimaldab UV-Vis spektroskoopiat rakendada ka *in situ* mõõtmiste jaoks ehk proovis olevaid ühendeid ja nende kontsentratsioone on võimalik määrata ka proovi plasmaga töötlemise ajal, mõjutamata proovis toimuvaid keemilisi protsesse erinevate reagentidega. Lisaks on UV-Vis spektroskoopia üldiselt rakendatav nii tahkiste, vedelike kui ka gaaside jaoks. [10]

Plasma meditsiinirakendused ja RONS-de bioloogiline toime

Madalatemperatuurilisi atmosfääri rõhul töötavaid plasmasid on rohkelt uuritud eeskätt kasutatavuse tõttu meditsiinirakendustes. Madal temperatuur ja paindlikkus kontrollida mitmeid parameetreid nagu radikaalide ja ionide koosseisu ja kontsentratsiooni, UV kiirgust ja elektrivälja pakuvad rohkelt võimalusi plasma ja bioloogilise aine vaheliste interaktsioonide uurimiseks. Ühe esimese plasma bioloogilise mõjuna täheldati plasma antibakteriaalset toimet. Plasmatöötamise bioloogiline toime on leidnud kasutust nii pindade desinfitseerimisel, kui ka haavade, naha- ja seenhaiguste ning hammaste ravimisel. Lisaks meditsiinirakendustele on

plasma antibakteriaalne toime leidmas üha enam rakendust ka toiduainetööstuses, näiteks lihatoodete ohutuse ja parema säilimise tagamisel.[11][12]

Erilist tähelepanu on madalatemperatuuriline plasma leidnud vähiravi uuringutes, kuna see on näidanud vähivastast toimet väga erinevate vähitüüpide korral. Plasma toimet hävitada selektiivselt vähirakke võrreldes normaalse rakkudega on tuvastatud mitmetes uuringutes[13] [14]. Seni on madalatemperatuurilise plasma märkimisväärsed vähivastaseid omadusi täheldatud melanoomide [15], glioblastoomi rakkude (agressiivseim ja levinuim ajukasvaja) [16], leukeemia rakkude [17] ja paljude teiste vähirakkude korral [4].

Kaks peamist viisi plasma rakendamiseks biomeditsiinilistes uuringutes on:

- 1) Kaudne töötlus, kus esmalt toimub vee või muu vedeliku töötlus plasmaga, misjärel viiakse töödeldud vedelik kontakti uuritava bioloogilise prooviga.
- 2) Otsene töötlus, kus toimub bioloogilise proovi vahetu kiiritamine plasmaga.

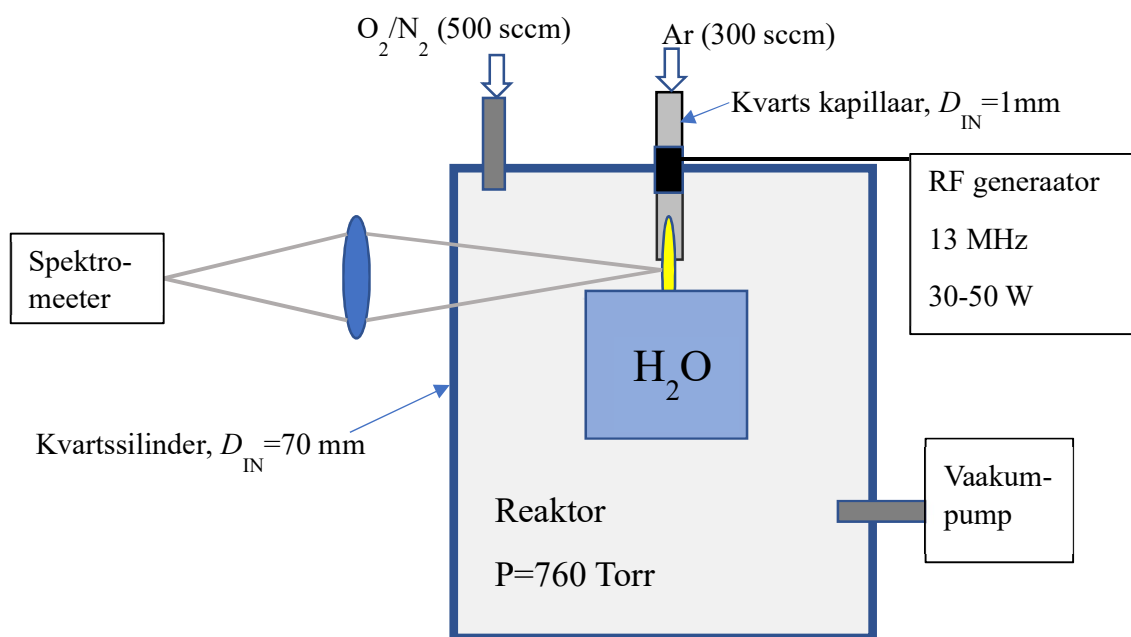
Esimesena mainitud töötluse viis tugineb suhteliselt pikaajaliste reaktiivsete ühendite nagu H_2O_2 , NO_2^- , NO_3^- , O_3 jt toimel. Teise meetodi puhul võivad lisaks neile toimet avaldada ka lühiealised ühendid nagu hüdroksüülrühm OH^- ja superoksiid O_2^- [5] ning plasmaga kaasnev ultraviolettkiirgus [18]. Kuigi varem prevaleerisid uuringud otsese töötlusega, on viimastel aastatel leitud, et sarnane toime nagu otsesel töötlusel esineb ka kaudse töötluse korral. Kaudse meetodi suurimaks eeliseks on võimalus efektiivselt piirata vähi arengut ka näiteks siseorganites süstides sinna plasma-aktiveeritud vedelikku [19] [20]. Sügavamal paiknevate koekihide ja siseorganite otsene töötlus on raskendatud, kuna eeldab plasmaallika viimist töödeldava kohani.

Oletatakse, et vähirakkude märkimisväärselt suurem tundlikkus plasma poolt tekitatud RONS-i vastu tuleneb vähirakkude kõrgemast basaalsest rakusisesest ROS-i hulgast, teatud transportvalkude (akvaporinide) kõrgema ekspressiooni tasemest ja rakumembraani koostisesse kuuluva kolesterooli fraktsiooni väiksemast hulgast [21][22]. Peamiselt seostatakse plasma-aktiveeritud vedeliku vähivastast toimet H_2O_2 , NO_2^- ja NO_3^- mõjuga ja on näidatud, et võtmerolli toime initsieerimisel omab H_2O_2 , kuid ilma teiste reaktiivsete ühenditeta on kasvajakasvaste toime nõrgem [23].

Eksperimentaalne osa

Katseseadme ehitus ja tööpõhimõte

Plasmaseadme põhimõtteline ehitus on esitatud joonisel 1 ning fotodel 1 ja 2 on esitatud vee töötlemine plasmajoaga N_2 keskkonnas. Plasma tekitatakse esmalt 1 millimeetrise siseläbimõõduga kvartskapillaaris argooni gaasivoos, mille vooluhulka kontrollib massivookontroller Alicat Scientific (gaasivoog reguleeritav vahemikus 0 kuni 1000 standard kuupsentimeetrit minutis (sccm)). Plasma tekitamiseks rakendati kapillaari ümbritsevale elektrodile, mis paiknes 10 mm kapillaari otsast ülevalpool kõrgsagedussignaali, kasutades kõrgepingeallikat Kurt J. Lesker AT6 (sagedus 13,6 MHz ja maksimaalne võimsus 600W). Pinget mõõdeti ostsillooskoobiga Tektronix 540 B, kasutades tööstuslikku pingejagurit P6139A (jagamistegur 1:10) ja plasmafüüsika laboris valmistatud mahtuvuslikku pingejagurit jagamisteguriga 1:100. Kui plasmajuga tekitati õhus, oli reaktor avatud (st puudus kvartssilinder). Kui mõõtmine tehti mõne teise taustgaasiga (O_2 või N_2), siis oli reaktor välisõhust kvartsist silindriga isoleeritud. Taustgaas juhiti reaktorisse eraldi trakti kaudu, mida kontrollis massivoo kontroller Alicat Scientific (gaasivoog reguleeritav vahemikus 0 kuni 1000 sccm).



Joonis 1. Plasmaseadme skeem

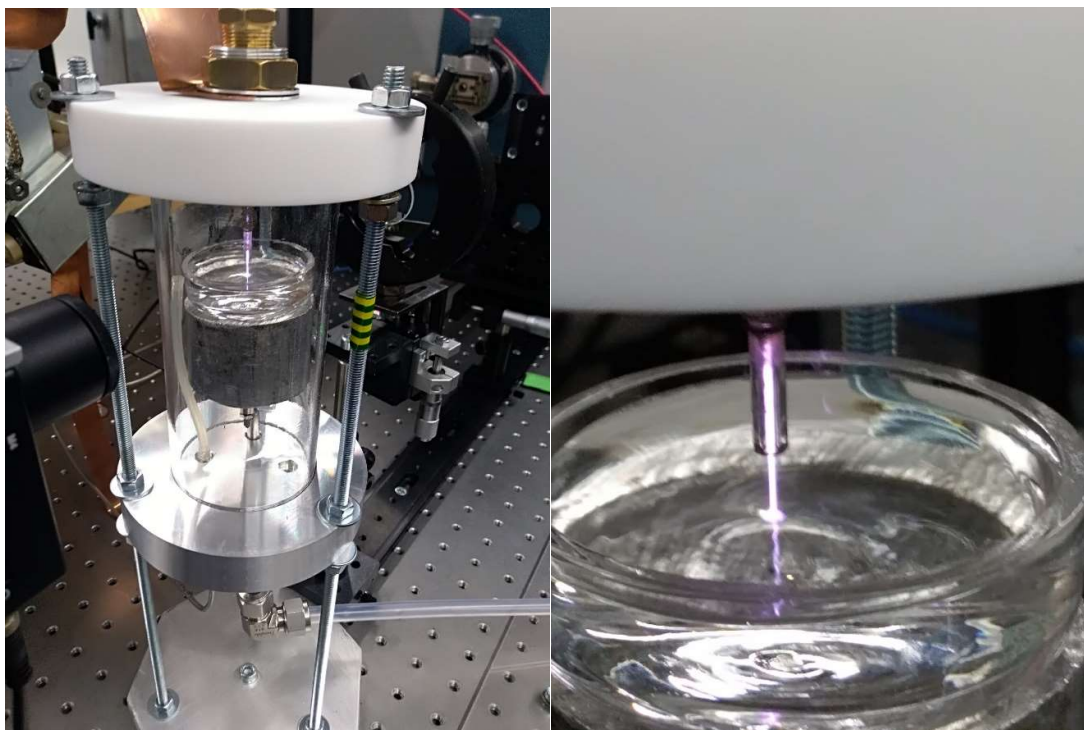


Foto 1. Vee plasmatöötlus suletud reaktoris.

Foto 2. Plasmajuga kontaktis veega

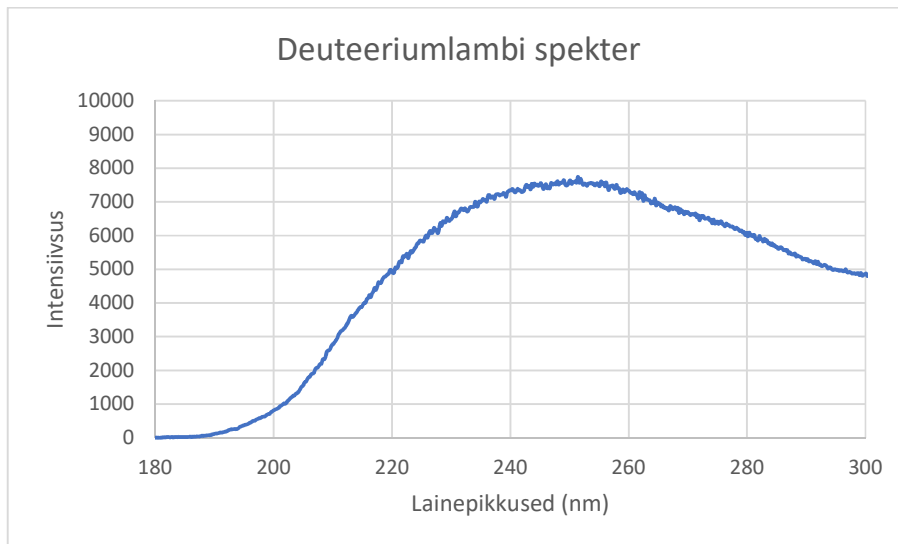
Deioniseeritud vee töötlemisel asetati Petri tassis olev vesi (12 ml) alusele, vee pind asetses kapillaari otsast 5 mm kaugusel. Enne vee plasma töötlust, toimus gaasitrakti puhastamine. Selleks vakumeeriti kogu vaakumsüsteemi umbes 1 tunni jooksul baasrõhuni $2 \cdot 10^{-2}$ Torr. Seejärel täideti see argooniga ning pumbati rõhuni 0.1 Torr (aja kokkuhoiu huvides ei oodatud baasvaakumini jõudmist). Nii toimiti 10 korda. Järgnevalt tekitati massivoo kontrollereite abil eksperimendis vajalikud plasma- ning taustgaasivood, avati reaktor ja asetati Petri tass deioniseeritud veega alusele. Juhul kui töötlus toimus N_2 või O_2 taustgaasidega, suleti reaktor taas ja tehti uuesti 10 süsteemi loputust kasutatavate gaasidega, et puhastada reaktor õhust. Seejuures sai rõhku langetada kuni 100 Torrini, sest madalamatel rõhkudel hakkas plasmatraktist tulev gaasivoog vedelikku anumast välja paiskama. Viimaseks reguleeriti rõhk reaktoris stabiilseks 760 Torrini ja oodati 5 minutit, pärast mida sai alustada plasma töötlustega. Plasma süüdati Tesla generaatori abil, rakendades signaalelektroodile eelnevalt kõrgsagedusliku pinget. Võimsuse valikul lähtuti sellest, et plasma püsiks vedelikuga kontaktis kogu töötamise vältel. Kõigi kolme keskkonna jaoks sobivaks minimaalseks võimsuseks osutus 50W, mis määrati eksperimentaalselt. Kõrgemate võimsuste juures toimus vedeliku suur aurumine, mistõttu vahemaa kapillaari otsa ja veepinna vahel suurenes ning pikemaajalise

töötluste korral kontakt plasma ja vee vahel kadus. Pärast töötlust pipeteeriti vedelik küvetti (pikemate töötluste korral ka lahjendati töötlemata deioniseeritud vee lisamisega), samaaegselt mõõdeti neeldumisspektrid, lahuse pH ja lisati plasma-aktiveeritud vedelik rakkudele.

Mõõtmiste läbiviimine ja andmetöötlus

Plasma karakteriseerimiseks mõõdeti plasma kiirgusspektrid spektromeetritega Ocean Optics USB4000 ja MDR23. Ocean Optics'i spektromeeter võimaldas kiirelt mõõta kogu spektri vahemikus 190-900 nm lahutusvõimega ~ 1 nm. Seda kasutati spektri mõõtmiseks piki plasmajuga (läätsel abil tekitati spektromeetri avause kaugusel üks-ühene kujutis plasmajoast), et saada teavet plasma koostise kohta nii plasmatrakti sees (st kvartstorus) kui ka gaasikeskkonnas. MDR23 võimaldas mõõta kiirgust korraga ühel lainepikkusel, kuid omas see eest oluliselt paremat lahutusvõimet $\sim 0,6$ Å. MDR23 kasutati elektronide tiheduse määramiseks plasmas.

Neeldumisspektrite mõõtmiseks kasutati UV allikana Hamamatsu L2D2 deuteriumampi (lambi spekter toodud joonisel 2), millest tulev kiirgus kollimeeriti kumerläätsel (fookuskaugusega 5,5 cm) abil ning seejärel kitsendati diafraggaga ca 1 mm läbimõõduni ja suunati läbi plasma-aktiveeritud /deioniseeritud vedelikku sisaldava kvartsküveti (vedelik pipeteeriti pärast töötlust Petri tassist ümber küvetti ja vajadusel lahjendati). Pärast küvetti asus teine kumerlääts (fookuskaugusega 7,5cm), mis koondas proovi läbinud kiirguse spektromeetri (Ocean Optics USB4000) sisendavale. Referentsspektri registreerimine toimus vahetult enne plasma-aktiveeritud vedeliku neeldumisspektri mõõtmist. Ülesseatud katseseade neeldumisspektrite mõõtmiseks on toodud fotol 3.



Joonis 2. Hamamatsu L2D2 deuteeriumlambi kiirgusspekter uuritavas piirkonnas

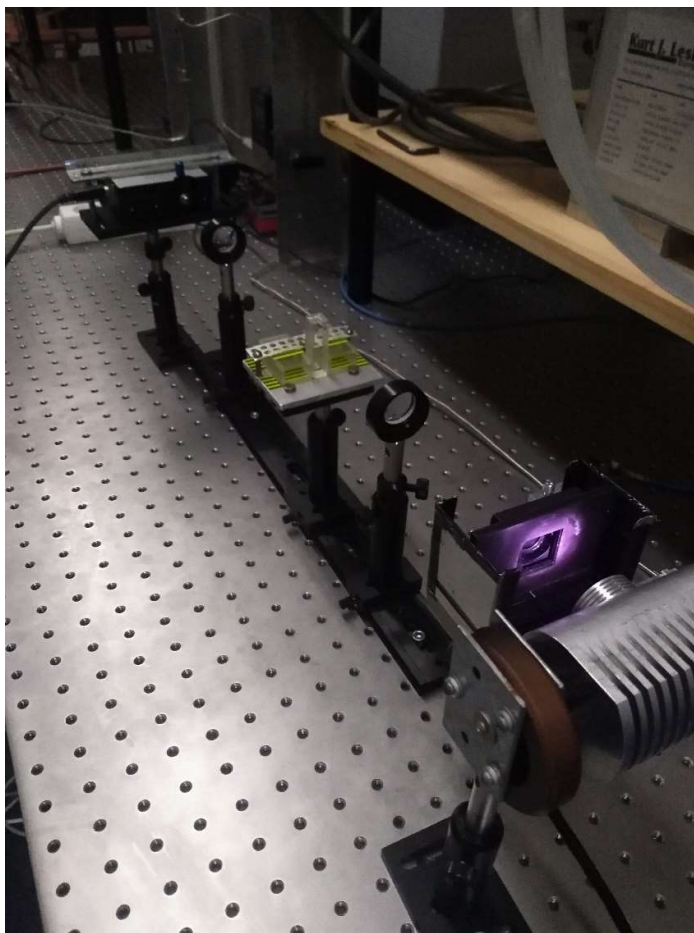


Foto 3. Ülesseatud katseseade neeldumisspektrite mõõtmiseks

Lisaks neeldumisspektrile mõõdeti plasmatöötluste järgselt ka lahuse pH, mis samuti karakteriseerib vedelikfaasi.

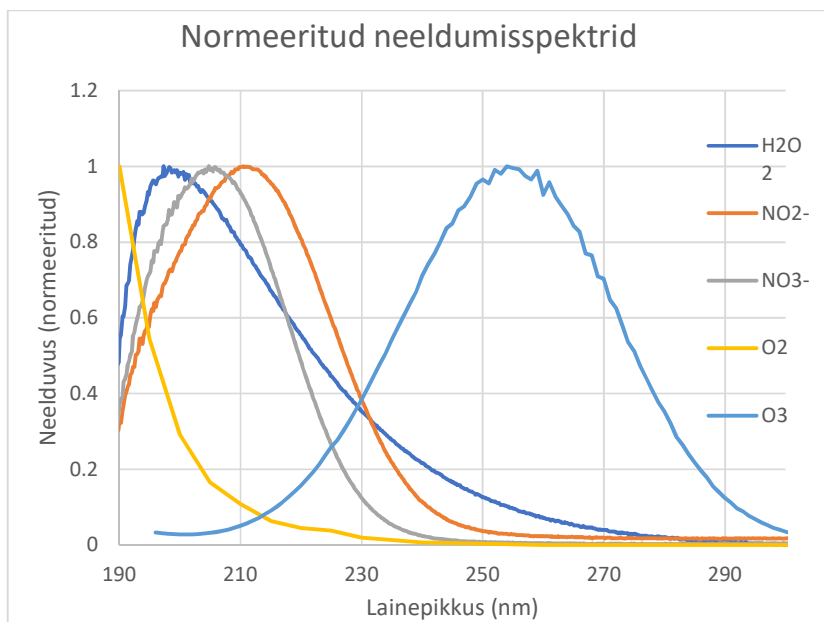
Elulemuse katsed viidi läbi Tartu Ülikooli siirdemeditiinikeskuses (SIME) ja käesoleva töö autor ise neid läbi ei viinud (puudus nõutud koolitus). Elulemuskatsetes kasutati rinnavähi rakuliini 4T1. 200 µl vähirakkude suspensiooni (50 000 vähirakku 1 ml toitelahuses) pipeteeriti 96 avausega mikroplaadi avasse. Seejärel hoiti rakukultuure 24 tundi inkubaatoris, mis tagas sobiva temperatuuri (37°C), õhuniiskuse ja CO₂ sisalduse (5%), ning selle ajaga kinnitusid vähirakud mikroplaadile. Inkubeerimise järgselt asendati toitekeskkond uuega, millele lisati nüüd juurde ka plasma-aktiveeritud vesi või deioniseeritud vesi (kontrollproov). Katsetes kasutati kahte plasma-aktiveeritud vedeliku ja toitelahuse vahekorda: 1:3 ja 1:1. Peale töötlust inkubeeriti vähirakud 48 tundi, pärast mida määrati rakkude elulemus MTT (3-(4, 5-dimetüültiasool-2-üül)-2,5-difenüültetrasoolbromiid) analüüsiga. MTT analüüsiga määratakse rakkude elulemus mitokondrite aktiivsuse abil, kuna teatud mitokondri ensüümid muudavad kollase MTT violetseks formasaaniks. Reaktsioonil lasti toimuda 4h, pärast mida eemaldati ettevaatlikult lahus ja plaadi põhjas olevad formasaani kristallid lahustati isopropanoolis ning mõõdeti lahuse neelduvus 570 nm juures. Elulemuse tulemused on antud kontrollproovide suhtes.

Vedeliku töötlus toimus kolmes erinevas gaasikeskkonnas: õhus, puhtas hapnikus ja puhtas lämmastikus samal generaatori võimsusel (50 W). Kõigi kolme juhu korral mõõdeti plasma kiirgusspektrid. Kõigis kolmes keskkonnas viidi läbi plasmaga vedeliku töötlus ja töötlemise kestvust varieeriti poolest minutist poole tunnini, pärast mida mõõdeti proovi neelduvus ja samaaegselt lisati plasma-aktiveeritud vedelik ka rakkudele.

Andmetöötlus

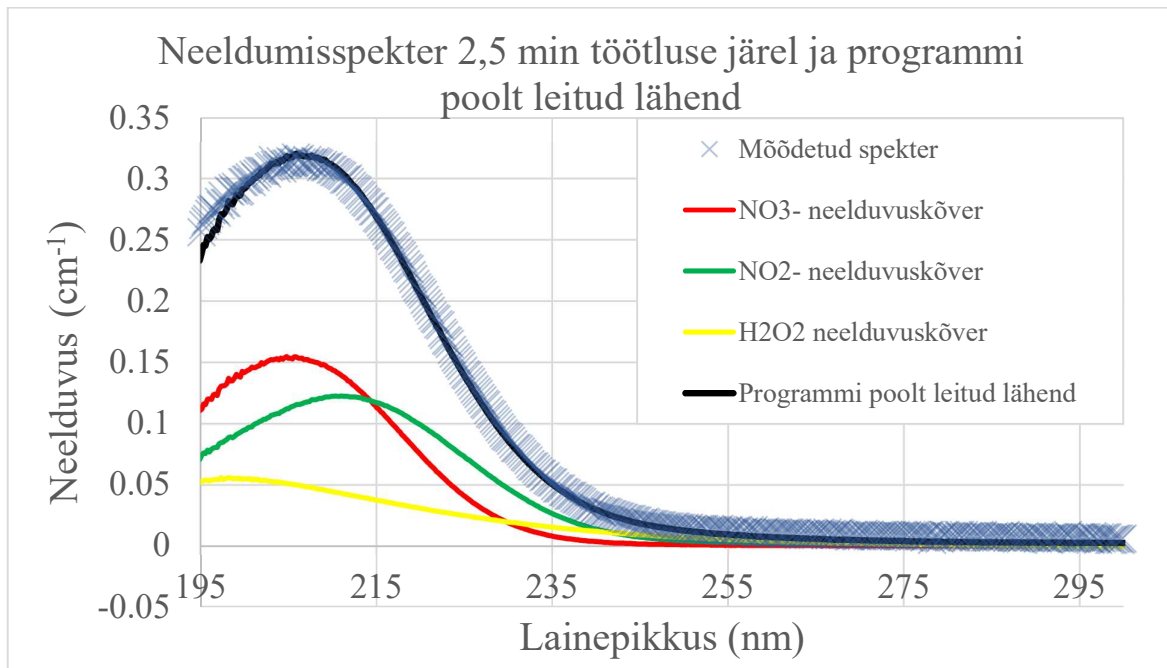
Selleks, et teada saada reaktiivsete ühendite koosseis ja kontsentratsioon töödeldud vedelikus, lähendati üksikute ühendite teadaolevad neeldumisspektrid (Joonis 3) lineaarse kombinatsioonina katses mõõdetud neeldumisspektrile, milles põhjustavad neelduvust mitu ühendit. H₂O₂, NO₂- ja NO₃- neeldumisspektrid erinevatel kontsentratsioonidel olid varasemalt mõõdetud (Rasmus Talviste ja Indrek Jõgi poolt) ja leitud, et esineb lineaarne seos neeldumise ning uuritava ühendi kontsentratsiooni vahel. Seejuures erinevatel kontsentratsioonidel registreeritud ning seejärel normeeritud neeldumisprofiilid langesid praktiliselt kokku.

Käesoleva töö raames neid katseid ei korratud. Teades, kuidas lahuse neelduvus sõltub neelava ühendi kontsentratsioonist, on võimalik intra- ja ekstrapoleerimise teel määrata ühendi kontsentratsiooni lahuses. Lisaks olid teada ka O_2 ja O_3 neeldumisspektrite kuju, kuid nende jaoks puudus teave selles osas, kuidas sõltub neelduvus kontsentratsioonist, mistõttu oli nende puhul võimalik määrata vaid suhtelisi muutusi.



Joonis 3. Normeeritud neeldumisspektrite näited teadaolevate ühendite jaoks

Lähendi leidmiseks kasutati tarkvara Mathcad15, kuna see on plasmafüüsika laboris kasutusel ka muuks andmetöötlusteks ning võimaldab ka lihtsamaid programme ja algoritme kirjutada. Lähend leiti, proovides süstemaatiliselt läbi erinevaid koefitsiente, millega korrutati läbi teadaolevate ühendite neeldumisspektrid ja summeeriti need kokku. Lähendi kokkulangevust määrati vähimruutude meetodil, mille korral arvutati iga andmepunkti jaoks erinevus katsetulemuse ja lähendi vahel, misjärel võeti need erinevused ruutu ja summeeriti üle kogu spektri. Vähima vastava väärtusega lähendi valis programm välja kui täpseima. Kuna neeldumisspektrite puhul on oluline piirkond 210-250 nm vahemikus, lisati algoritmile kaalud, et eelistataks lähendeid, mis ühtivad katsetulemustega kõige paremini just selles spektri piirkonnas. Programmi töö tulemusena saadud lähendi näide on toodud joonisel 4.



Joonis 4. Töödeldud vedeliku neeldumisspekter koos programmi poolt leitud lähendi ja üksikute komponentide spektritega

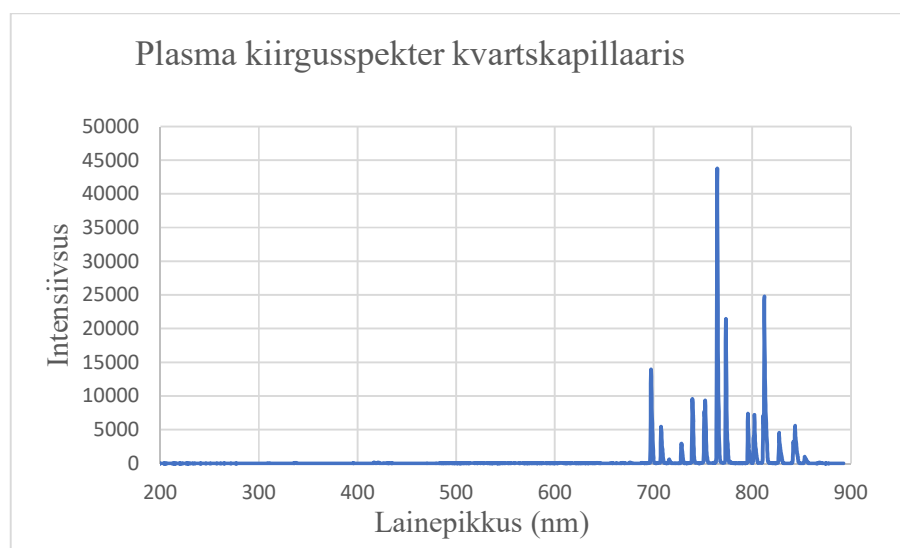
Üheks suurimaks antud programmi miinuseks on aeg, mis kulub spektrite analüüsimiseks. Esiteks koosnevad spektrid üpris suurel hulgal katsepunktidest ja teiseks on läbi proovitavate koefitsientide kõikvõimalike permutatsioonide arv üpris suur. Võimalike permutatsioonide arv ja arvutusteks kuluv aeg kasvab märkimisväärselt sõltuvalt sellest kui mitme ühendi neelduvusspektreid lähendi leidmisel kasutada. Üks meede ajakulu vähendamiseks oli kasutada Mathcad'i funktsioone *cspline* ja *interp*, mille abil on võimalik neeldumisspektritest tekitada matemaatilised mudelid, millede korral saab vähendada andmepunktide arvu, mõjutamata vastava kõvera kuju olulisel määral.

Tulemused ja analüüs

Plasmafaasi karakteriseerimine

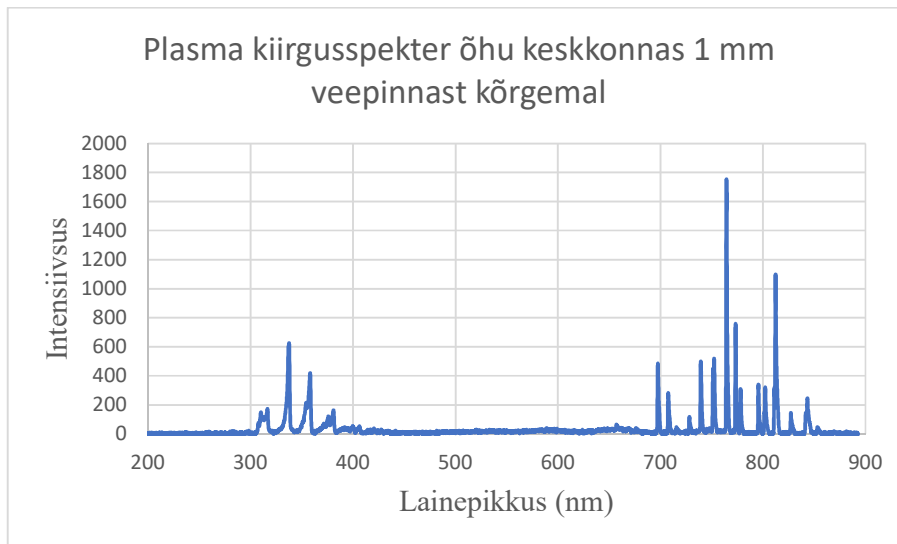
Kiirgusspektrid

Plasma kiirgusspektritest on näha, et plasmatrakti sees, sõltumata keskkonnast, on peaaegu puhas argoon, sest spektris kajastuvad vaid argooni spektrijooned 700-850 nm vahemikus (Joonis 5). Spektris puuduvad saastegaaside spektrid- ei ole atomaarse hapniku spektrijoont lainepikkuse 777 nm juures, OH molekulaarset spektririba 308 nm juures, samuti puuduvad taustgaasi - N₂ ribad. [24][25]

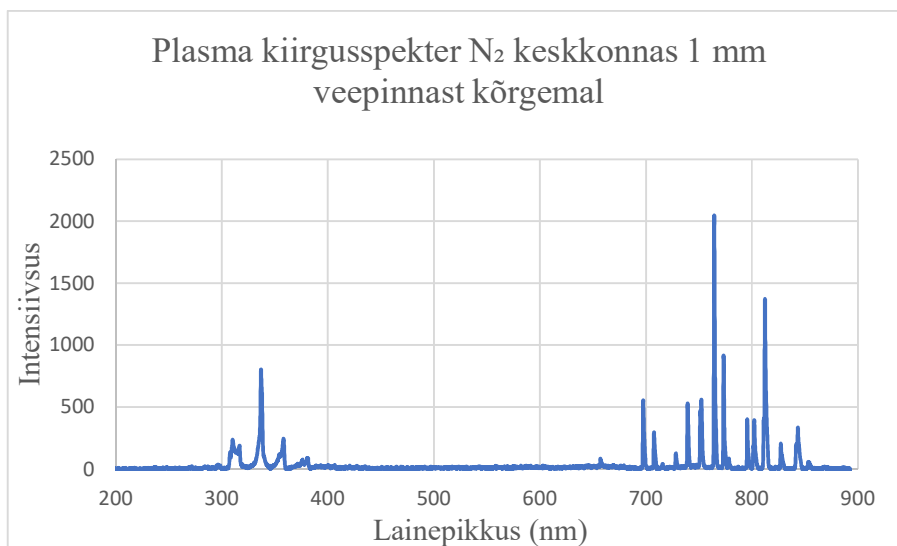


Joonis 5. Plasma kiirgusspekter kvartskapillaaris (5mm kapillaari otsast ülesvoolu) Lämmastiku keskkond

Kvartskapillaari otsast 4 mm allavoolu (väljaspool kapillaari), vahetult veepinna lähedal (~1mm töödeldava vedeliku pinnast kõrgemal) kajastuvad sõltuvalt keskkonnast erinevate molekulide ja aatomite spektriribad ja -jooned. Öhu ja puhta lämmastiku keskkonna korral (Joonis 7 ja Joonis 7) on näha OH intensiivne riba 308 nm juures (elektroonne üleminek B-A), selgelt eristuv lämmastiku teine positiivne süsteem (üleminek C-B), mille intensiivseimad spektriribad on 337 ja 357 nm juures, väikese intensiivsusega on N₂ esimese positiivse süsteemi ribad (üleminek B-A) 500 ja 700 nm vahel.

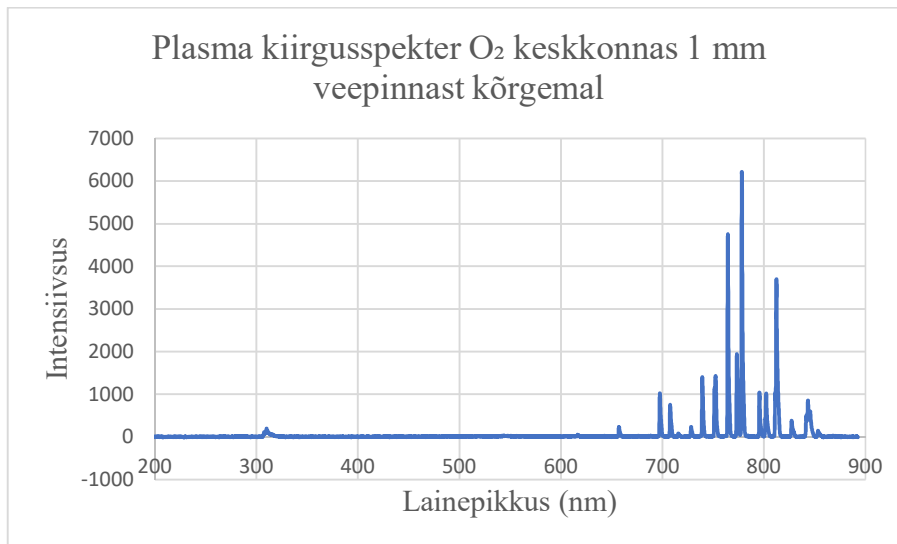


Joonis 6. Plasma kiirgusspekter 1 mm veepinnast kõrgemal. Õhu keskkond



Joonis 7. Plasma kiirgusspekter 1 mm veepinnast kõrgemal. Lämmastiku keskkond

Õhu ja puhta hapniku keskkonnas (Joonis 6 ja Joonis 8) eristub atomaarse hapniku spektrijoon 777 nm juures [24], mis puhta hapniku keskkonnas on intensiivseim spektrijoon. Hapniku spektrijoon puhta lämmastiku keskkonnas on väga väikese intensiivsusega ja peaaegu taustast eristamatu; ilmselt on see tingitud hapniku aatomitest, mis on tekkinud vedelikfaasist H₂O dissotseerumisel.



Joonis 8. Plasma kiirgusspekter 1 mm veepinnast kõrgemal. Hapniku keskkond

Puhtas hapniku keskkonnas on kiirgusspektris eristatav ka OH⁻ spektririba 308 nm juures, kuid õhu ja lämmastiku keskkonna korral langeb see kokku lämmastiku teise positiivse süsteemiga ning pole nii hästi eristatav. Kõigis keskkondades on ka vesiniku aatomi joon 656 nm juures jälgitav, kuid selle intensiivsus on samuti väike, mistõttu on see taustast raskesti eristatav.

Elektronide kontsentratsioon

Elektronide kontsentratsiooni määramine toimus vastavalt spektraalsele meetodile, mis on esitatud artiklis [26]. Selleks mõõdeti kiirguse intensiivsus kolmel lainepikkusel: 750,4 nm, 738,4 nm ja 763,5 nm, mis vastavad ergastatud argooni üleminekutele 2p1-1s2, 2p3-1s4 ja 2p6-1s5. Suuremate elektronide kontsentratsioonide puhul nagu see on iseloomulik kõrgsageduslikule plasmajoale, on elektronide kontsentratsioonile tundlik seisundite 2p3 ja 2p6 hõivete suhe n_{2p3} / n_{2p6} . Seepärast kasutati analüüsis nendelt seisunditelt lähtuvate spektrijoonte intensiivsusi. Artiklis oli antud vastavate seisundite hõivete suhte sõltuvus elektronide kontsentratsioonist, teades lisaks vastavate spektraalüleminekute kiirgusliku ülemineku tõenäosusi sai nende spektrijoonte intensiivsuste järgi arvutada elektronide kontsentratsioonid. Tulemused koos lähteandmetega on toodud tabelis 1. Ilmnes, et kõige suurem elektronide kontsentratsioon oli O₂ keskkonnas ning kõige madalam elektronide kontsentratsioon N₂ keskkonnas.

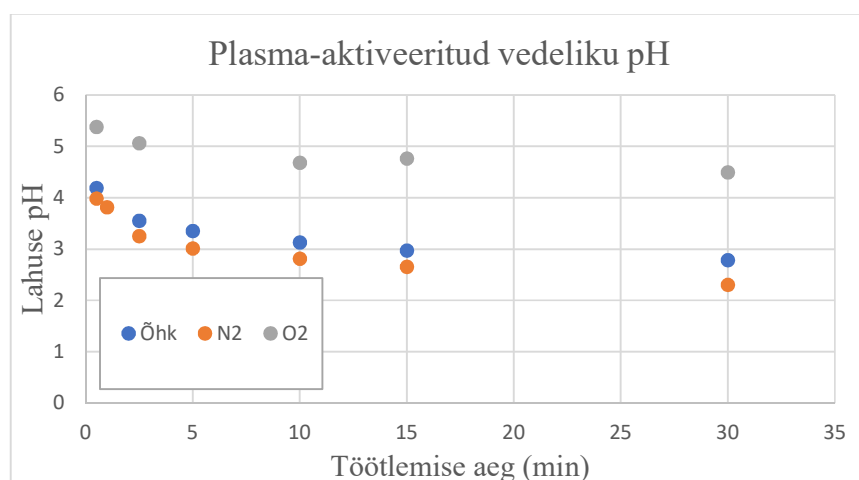
Gaasikeskkond	Intensiivsuste suhe I_{738}/I_{763}	Elektronide kontsentratsioon (cm^{-3})
N ₂	589/2884	$1,6 \cdot 10^{15}$
O ₂	1563/6707	$2,6 \cdot 10^{15}$
Õhk	555/2471	$2,3 \cdot 10^{15}$

Tabel 1. Elektronide kontsentratsioonid erinevate gaasikeskkondade korral

Vedelikfaasi karakteriseerimine

Lahuse pH

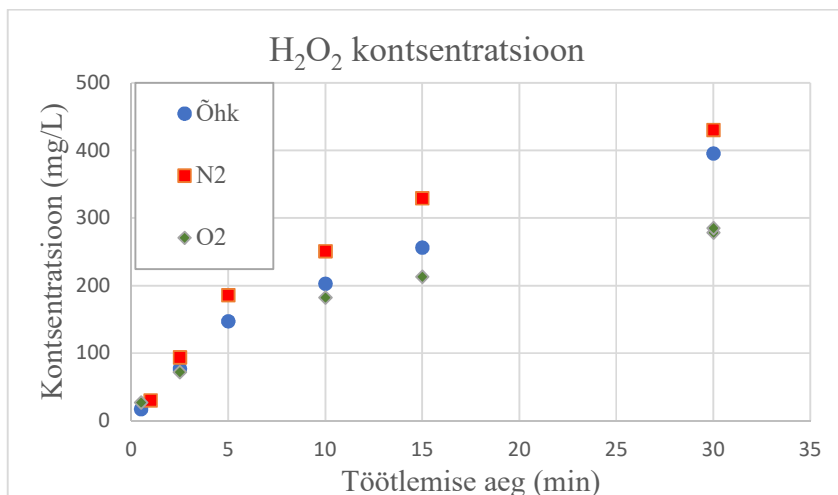
Plasma-aktiveeritud vedeliku pH mõõtmiste tulemused on toodud joonisel 9. Tulemustest ilmneb, et lämmastiku ja õhu keskkonnas langeb lahuse pH oluliselt madalamale võrreldes puhta hapniku keskkonnaga. See kinnitab kirjandust [8], mille kohaselt tekivad vesiniku ioonid lahusesse peamiselt lahustunud lämmastikoksiidide reaktsioonil veega. Seetõttu ei lange ka puhtas hapniku keskkonnas pH nii madalale, sest seal ei saa lämmastiku puudumise tõttu tekkida lämmastikoksiide.



Joonis 9. Plasma-aktiveeritud vedeliku pH erinevate keskkondade ja töötlemise aegade korral

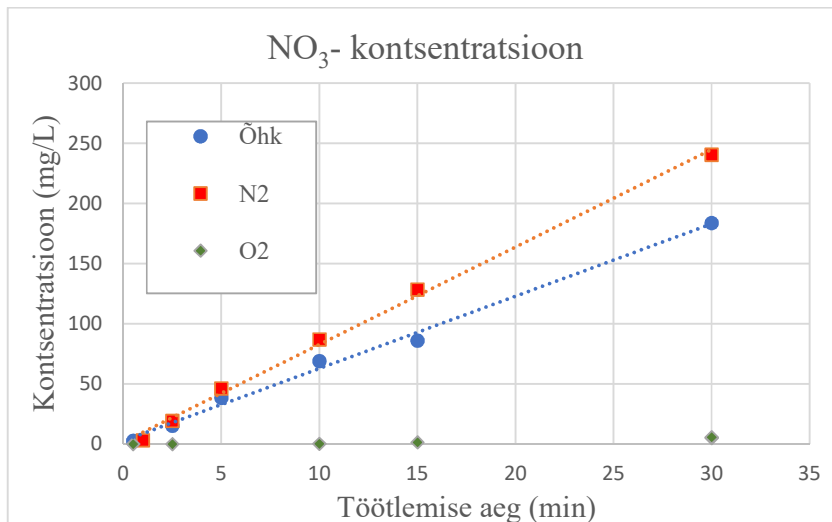
Plasma-aktiveeritud vedeliku reaktiivsete ühendite kontsentratsioonid

Plasmatöötlust järgselt mõõdetud neeldumisspektrite analüüsi tulemused on toodud kolmel järgneval graafikul. Igal graafikul on toodud ühe reaktiivse ühendi kontsentratsioonid sõltuvalt töötluste kestvusest kõigi kolme gaasikeskkonna korral.

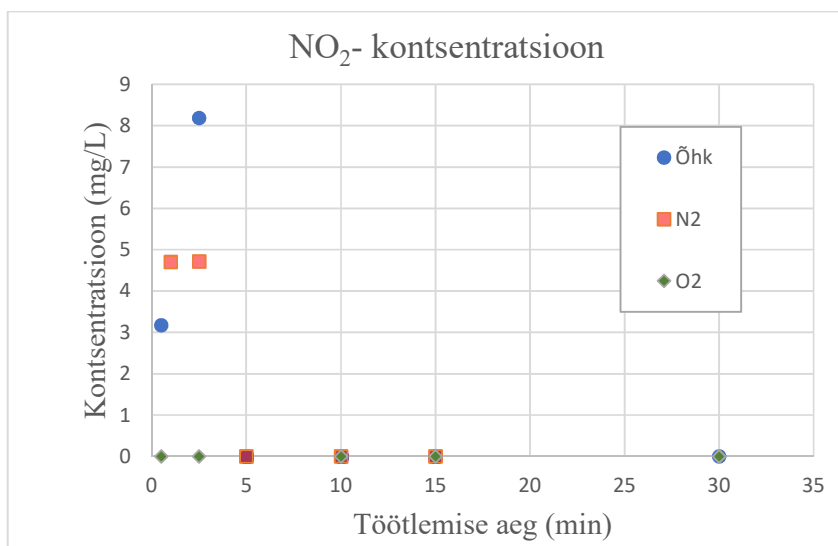


Joonis 10. H_2O_2 kontsentratsioon kolmes gaasikeskkonnas sõltuvalt plasmataotluse ajast

Tulemustest lähtuvalt moodustus vesinikperoksiidi kõigis keskkondades ning selle kontsentratsioon töödeldud vedelikus oli kõrge. See on kooskõlaline tulemus, sest vesinikperoksiid tekib peamiselt vee molekulide dissotsiatsioonist tekkinud $OH\cdot$ radikaalide [27] omavahelises reaktsioonis. Kirjanduse põhjal on üheks vee molekulide dissotsiatsiooni võimaluseks elektronlööki [27], mille põhjal võiks suurema elektronide kontsentratsiooni korral ka H_2O_2 kontsentratsioon olla suurem. Käesolevas töös aga ilmnes vastupidine: N_2 keskkonnas, kus oli H_2O_2 kontsentratsioon kõige suurem (Joonis 10), oli elektronide kontsentratsioon kõige väiksem (Tabel 1). Seda vastuolu võib seletada sellega, et H_2O dissotsiatsioon sõltub lisaks elektronide kontsentratsioonile ka elektronide keskmisest energiast. Antud uuringu raames elektronide keskmist energiat ei määratud, kuid spektraalandmed viitavad, et see on õhu ja N_2 keskkonnas ühesugune ja suurem kui O_2 keskkonnas. Sellised tendentsid tehti kindlaks võrreldes kaht Ar diagnostilist joont 750 ja 751 nm, millest esimese ergastamine elektronlöögiga eeldab suuri elektroni energiasid (ergastatakse valdavalt Ar põhiseisundist), teise ergastamine toimub aeglasemate elektronidega (ergastatakse valdavalt Ar aatomi metastabiilselt seisundilt). O_2 keskkonna korral oli 750 nm joone intensiivsus võrreldes 751 nm intensiivsusega väiksem, st ka elektronide keskmine energia oli väiksem.



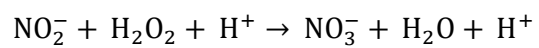
Joonis 11. NO₃- kontsentratsioon kolmes gaasikeskkonnas sõltuvalt plasmatöötlemise ajast



Joonis 12. NO₂- kontsentratsioon kolmes gaasikeskkonnas sõltuvalt plasmatöötlemise ajast

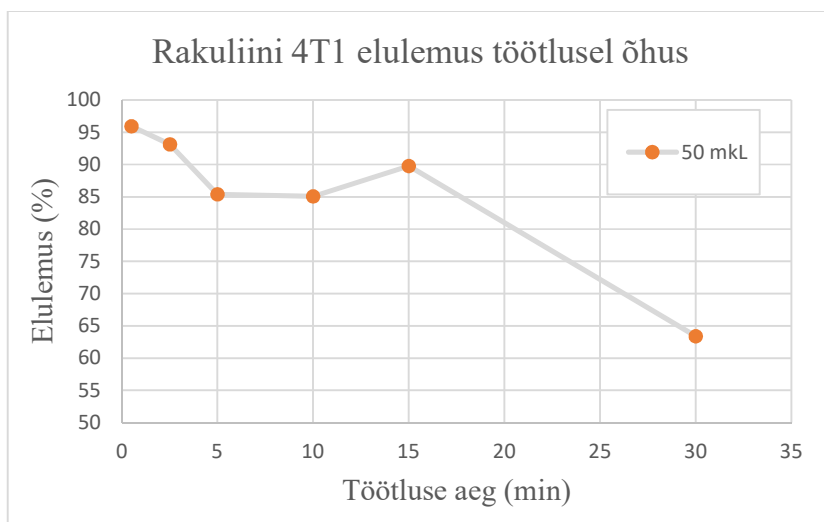
NO₂- ja NO₃- kontsentratsioonide puhul on näha, et puhtas hapniku gaasikeskkonnas neid ühendeid praktiliselt ei teki. See tulemus annab kinnitust, et töös rakendatud protseduur puhta gaasikeskkonna tekitamiseks on efektiivne ning mõjutab ka vedelikus lahustunud gaase. Õhu ja lämmastiku keskkondades kasvas NO₃- kontsentratsioon lineaarselt kogu töötlemise kestel. NO₂- leidub lahuses ainult väikeste töötlemise aegade korral (alla 5 minuti). See tulemus langeb kokku kirjanduse andmetega [8], mille põhjal on NO₂- happelises keskkonnas ebastabiilne. pH mõõtmistest lähtuvalt langebki töödeldava lahuse pH 2,5 ja 5 minuti vahel alla 3,5, mistõttu ei

ole NO₂⁻ enam stabiilne. Tõenäoliselt toimub sealt edasi happelisest keskkonnast tingituna reaktsioon NO₂⁻ ja vesinikperoksiidi vahel, mille tulemusena tekib NO₃⁻ ja vesi. [8][28]

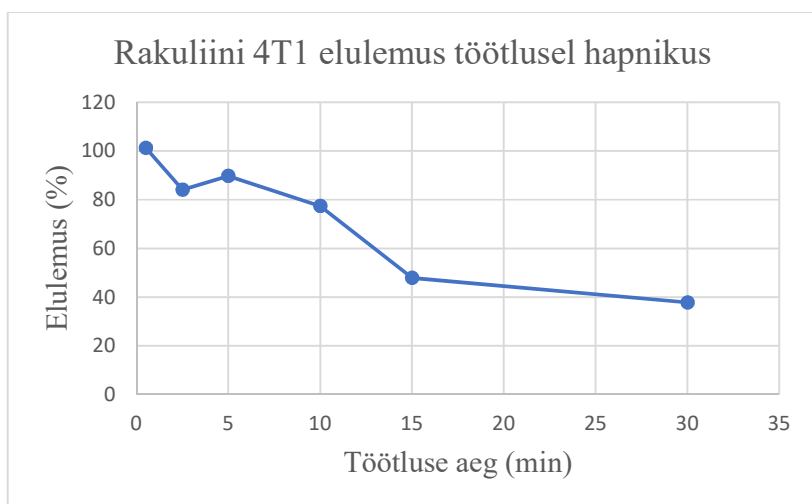


Vähirakkude elulemusuuringute tulemused

Elulemuskatsetest, mis viidi läbi rinnavähi rakuliini 4T1 kasutades. Ilmnes, et nii õhu kui hapniku keskkonnas töödeldud veel oli surmav toime vähirakkude jaoks. Sama töödeldud vee ja toitelahuse vahekorra puhul oli hapnikus töödeldud vesi tõhusam kui õhus töödeldud vesi. Näiteks 50 µl töödeldud veega läbi viidud elulemuskatsete korral oli vähirakkude elulemus hapniku keskkonnas töödeldud vees 40% võrreldes kontrollprooviga. Samas õhus töödeldud vee puhul oli vähirakkude elulemus kõrgem: 60%.

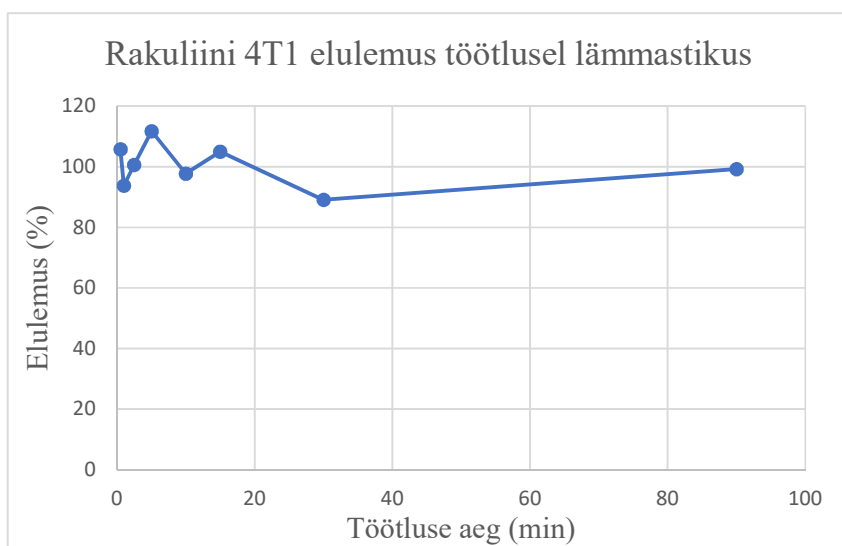


Joonis 13. Elulemuse tulemused õhus töödeldud vee korral



Joonis 14. Elulemuse tulemused hapnikus töödeldud vee korral

Vastuolulise tulemusena ilmnas lämmastiku keskkonnas töödeldud vee mõju vähirakkudele, mille korral ei täheldatud sisuliselt mingisugust mõju vähirakkudele. Käesolevas töös määratud RONS-i koosseisu ja kontsentratsioonide poolest sarnanes lämmastiku keskkonnas töödeldud vesi õhus töödeldud veele. Seega oleks võinud eeldada ka lämmastiku keskkonnas töödeldud vee selektiivset vähirakkude vastast toimet. Mõju puudumine võib viidata sellele, et lämmastiku keskkonnas ei teki vee plasmatöötamise ajal mõnda olulist reaktiivset ühendit, mida käesolevas töös ei määratud, kuid millel on oluline mõju vähirakkudele. Oluline on ka, et pH ei mõjutanud elulemuskatsete tulemusi. Hoolimata väga madalast pH-st vee töötlemisel lämmastiku keskkonnas, elulemust see ei mõjutanud. Seda võib seletada sellega, et rakukultuuri näol oli tegemist puhverdatud lahusega.



Joonis 15. Elulemuse tulemused lämmastikus töödeldud vee korral

Järeldused

Käesoleva töö tulemustele tuginedes sai kinnitust plasmatöötluste gaasikeskkonna olulisus reaktiivsete ühendite koosseisule ja kontsentratsioonile. Gaasikeskkonda varieerides on väga otseselt võimalik mõjutada vedelikfaasis tekkivate ühendite koosseisu. Näiteks hapniku keskkonnas töödeldud vees ei tekkinud praktiliselt üldse reaktiivseid lämmastikuühendeid NO_2^- ja NO_3^- . See tulemus kinnitab ka, et käesolevas töös rakendatud meetod võimaldab tekitada puhtaid gaasikeskkondasid ning samuti vabaneda vees lahustunud gaasidest, tänu millele on võimalik konkreetsemalt uurida erinevate reaktiivsete ühendite mõju vähirakkude elulemusele.

Reaktiivsete lämmastikuühendite puhul ilmnes, et lämmastikku sisaldavates gaasikeskkondades kasvas NO_3^- kontsentratsioon lineaarselt töötluste ajaga. Samas NO_2^- märgatav kontsentratsioon esines vaid lühiajaliste töötluste korral (alla 5 minuti). Tuginedes ka plasma-aktiveeritud vedeliku pH mõõtmistele leidis kinnitust kirjanduses leitu, mille kohaselt NO_2^- pole stabiilne happelises keskkonnas ($\text{pH} < 3,5$) ning reageerib edasi nitraatiooniks NO_3^- .

Rinnavähi rakuliini 4T1 elulemuskatsetest ilmnes, et hapniku ja õhu keskkonnas töödeldud veel on vähirakkudele surmav toime, samas N_2 keskkonnas mõju elulemusele praktiliselt puudub. See viitab sellele, et lämmastiku keskkonnas ei teki vee plasmatöötluste ajal mõnda olulist reaktiivset ühendit, mida käesolevas töös ei määratud, kuid millel on oluline mõju vähirakkudele.

Kokkuvõte

Käesolevas bakalaureuse töös uuriti atmosfäärirõhulise madalatemperatuurilise argooni plasmajoa mõju deioniseeritud vette tekkivate reaktiivsete ühendite koostisele ja kontsentratsioonile ning sellise plasma-aktiveeritud vee mõju vähirakkude elulemusele. Töö eeliseks võrreldes varasemate uurimustega oli võimalus tekitada suletud keskkonnas muid gaasikeskkondasid kui õhk. Töös võrreldi kolme gaasikeskkonda: õhk, lämmastik ja hapnik.

Töös anti ülevaade madalatemperatuurilisest plasmast ning selle peamistest biomeditsiinilistest rakendustest ja uurimisvaldkondadest, millest põhjalikumalt käsitleti plasma töötamise mõju vähirakkude elulemusele. Lisaks käsitleti plasmakeemiat ja reaktiivsete hapniku- ja lämmastikuühendite tekkemehhanisme ning anti ülevaade peamistest meetoditest, millega on plasmast ja plasma poolt tekitatud reaktiivseid ühendeid uuritud. Põhjalikumalt käsitleti neeldumisspektroskoopiat, mida kasutati ka antud töös H_2O_2 , NO_2 - ja NO_3 - määramisel.

Kiirgusspektrite tulemustest ilmnas, et töös kasutatud meetod isoleeritud gaasikeskkonna tekitamiseks on tõhus, sest spektrites ei kajastunud saastegaase. Seda kinnitavad ka neeldumisspektrite tulemused, kus näiteks hapniku keskkonnas töödeldud vees ei tekkinud praktiliselt üldse reaktiivseid lämmastikuühendeid NO_2 - ja NO_3 -. See kinnitas, et gaasikeskkonda varieerides on otseselt võimalik mõjutada vedelikfaasis tekkivate ühendite koosseisu.

Reaktiivsete lämmastikuühendite puhul ilmnas, et lämmastikku sisaldavates gaasikeskkondades kasvas NO_3 - kontsentratsioon lineaarselt töötamise ajaga. Samas NO_2 -määrgatav kontsentratsioon esines vaid lühiajaliste töötuste korral (alla 5 minuti). Tuginedes ka plasma-aktiveeritud vedeliku pH mõõtmistele leidis kinnitust kirjanduses leitud, mille kohaselt NO_2 - pole stabiilne happelises keskkonnas ($\text{pH} < 3,5$) ning reageerib edasi nitraatiooniks NO_3 -.

Rinnavähi rakuliini 4T1 elulemuskatsetest ilmnas, et hapniku ja õhu keskkonnas töödeldud veel on vähirakkudele surmav toime, samas N_2 keskkonnas mõju elulemusele praktiliselt puudub. See viitab sellele, et lämmastiku keskkonnas ei teki vee plasmatöötamise ajal mõnda olulist reaktiivset ühendit, mida käesolevas töös ei määratud, kuid millel on oluline mõju vähirakkudele.

Tänuavaldused

Olen väga tänulik kõigile, kes aitasid kaasa lõputöö valmimisele. Eriliselt tänan oma juhendajaid Jüri Rauda ja Sirli Rauda, kes olid väga abivalmid ja vastutulelikud. Lisaks tänan Tartu Ülikooli plasmafüüsika labori sõbralikku kollektiivi.

Kirjanduse loetelu

- [1] Y. P. Raizer, *Gas Discharge Physics*, 1st ed. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1991.
- [2] J. Winter *et al.*, “Tracking plasma generated H₂O₂ from gas into liquid phase and revealing its dominant impact on human skin cells,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 28, 2014.
- [3] M. Keidar *et al.*, “Cold atmospheric plasma in cancer therapy,” *Phys. Plasmas*, vol. 20, no. 5, 2013.
- [4] M. Laroussi, X. Lu, and M. Keidar, “Perspective: The physics, diagnostics, and applications of atmospheric pressure low temperature plasma sources used in plasma medicine ARTICLES YOU MAY BE INTERESTED IN,” *J. Appl. Phys.*, vol. 122, p. 20901, 2017.
- [5] Y. Gorbanev, D. O’Connell, and V. Chechik, “Non-Thermal Plasma in Contact with Water: The Origin of Species,” *Chem. - A Eur. J.*, vol. 22, no. 10, pp. 3496–3505, 2016.
- [6] H. Jablonowski and T. von Woedtke, “Research on plasma medicine-relevant plasma-liquid interaction: What happened in the past five years?,” *Clin. Plasma Med.*, vol. 3, no. 2, pp. 42–52, 2015.
- [7] I. Jõgi, R. Talviste, J. Raud, K. Piip, and P. Paris, “The influence of the tube diameter on the properties of an atmospheric pressure He micro-plasma jet,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 41, 2014.
- [8] P. Lukes, E. Dolezalova, I. Sisrova, and M. Clupek, “Aqueous-phase chemistry and bactericidal effects from an air discharge plasma in contact with water: Evidence for the formation of peroxyxynitrite through a pseudo-second-order post-discharge reaction of H₂O₂ and HNO₂,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 23, no. 1, 2014.
- [9] P. J. Bruggeman *et al.*, “Plasma-liquid interactions: A review and roadmap,” *Plasma Sources Sci. Technol.*, vol. 25, no. 5, 2016.
- [10] G. S. K. Donald L. Pavia, Gary M. Lampman, *Introduction to Spectroscopy*, 3rd ed. Thomson Brooks/Cole, 2001.
- [11] G. Y. Park *et al.*, “Atmospheric-pressure plasma sources for biomedical applications,”

Plasma Sources Sci. Technol., vol. 21, no. 4, 2012.

- [12] N. N. Misra and C. Jo, “Applications of cold plasma technology for microbiological safety in meat industry,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 64, pp. 74–86, 2017.
- [13] D. Yan *et al.*, “The role of aquaporins in the anti-glioblastoma capacity of the cold plasma-stimulated medium,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 50, no. 5, 2017.
- [14] F. Saadati, H. Mahdikia, H. A. Abbaszadeh, M. A. Abdollahifar, M. S. Khoramgah, and B. Shokri, “Comparison of Direct and Indirect cold atmospheric-pressure plasma methods in the B16F10 melanoma cancer cells treatment,” *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–15, 2018.
- [15] H. J. Lee, C. H. Shon, Y. S. Kim, S. Kim, G. C. Kim, and M. G. Kong, “Degradation of adhesion molecules of G361 melanoma cells by a non-thermal atmospheric pressure microplasma,” *New J. Phys.*, vol. 11, 2009.
- [16] H. Tanaka *et al.*, “Plasma-Activated Medium Selectively Kills Glioblastoma Brain Tumor Cells by Down-Regulating a Survival Signaling Molecule, AKT Kinase,” *Plasma Med.*, vol. 1, no. 3–4, pp. 265–277, 2012.
- [17] N. Barekzi and M. Laroussi, “Dose-dependent killing of leukemia cells by low-temperature plasma,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 45, no. 42, 2012.
- [18] A. M. Hirst, M. S. Simms, V. M. Mann, N. J. Maitland, D. O’connell, and F. M. Frame, “Low-temperature plasma treatment induces DNA damage leading to necrotic cell death in primary prostate epithelial cells,” *Br. J. Cancer*, vol. 112, no. 9, pp. 1536–1545, 2015.
- [19] F. Utsumi *et al.*, “Effect of indirect nonequilibrium atmospheric pressure plasma on anti-proliferative activity against chronic chemo-resistant ovarian cancer cells in vitro and in vivo,” *PLoS One*, vol. 8, no. 12, pp. 1–10, 2013.
- [20] L. I. Partecke *et al.*, “Tissue Tolerable Plasma (TTP) induces apoptosis in pancreatic cancer cells in vitro and in vivo,” *BMC Cancer*, vol. 12, pp. 1–10, 2012.
- [21] W. Van Boxem *et al.*, “Anti-cancer capacity of plasma-treated PBS: Effect of chemical composition on cancer cell cytotoxicity,” *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–15, 2017.
- [22] A. Dubuc *et al.*, “Use of cold-atmospheric plasma in oncology: a concise systematic

review,” *Ther. Adv. Med. Oncol.*, vol. 10, pp. 1–12, 2018.

- [23] T. Adachi, H. Tanaka, S. Nonomura, H. Hara, S. I. Kondo, and M. Hori, “Plasma-activated medium induces A549 cell injury via a spiral apoptotic cascade involving the mitochondrial-nuclear network,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 79, pp. 28–44, 2015.
- [24] National Institute of Standards and Technology, “NIST Atomic Spectra Database,” 2019. [Online]. Available: https://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html. [Accessed: 16-Jun-2019].
- [25] J. Országh, M. Danko, A. Ribar, and Š. Matejčík, “Nitrogen second positive system studied by electron induced fluorescence,” *Nucl. Instruments Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. with Mater. Atoms*, vol. 279, pp. 76–79, 2012.
- [26] X. M. Zhu, Y. K. Pu, N. Balcon, and R. Boswell, “Measurement of the electron density in atmospheric-pressure low-temperature argon discharges by line-ratio method of optical emission spectroscopy,” *J. Phys. D. Appl. Phys.*, vol. 42, no. 14, 2009.
- [27] R. Thirumdas *et al.*, “Plasma activated water (PAW): Chemistry, physico-chemical properties, applications in food and agriculture,” *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 77, no. November, pp. 21–31, 2018.
- [28] G. Uchida, K. Kawabata, T. Ito, K. Takenaka, and Y. Setsuhara, “Development of a non-equilibrium 60 MHz plasma jet with a long discharge plume,” *J. Appl. Phys.*, vol. 122, no. 3, 2017.

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Aaro Abolkaln,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose
**DEIONISEERITUD VEE AKTIVEERIMINE PLASMAGA, SELLE MÕJU
VÄHIRAKKUDE ELULEMUSELE**

mille juhendajad on Jüri Raud, PhD ja Sirli Raud, PhD,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Aaro Abolkaln

17.06.2019